

Ваганова Людмила Анатольевна

**ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ
АМИНОАЦИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ДЛЯ ВОСПОЛНЕНИЯ ДЕФИЦИТА
КАЛЬЦИЯ**

03.01.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

Казань 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Лунева Светлана Николаевна

Официальные оппоненты:

- **Маянская Наиля Назибовна** - д.м.н., профессор, ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», кафедра биохимии, профессор кафедры .
- **Кадочникова Галина Деметьевна** – д.б.н., профессор, ФГБОУ ВПО «Тюменский государственный нефтегазовый университет, Технологический институт, кафедра товароведения и технологии продуктов питания, профессор кафедры.

Ведущая организация:

- Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Южно-Уральский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «29» мая 2014 года в 13 часов на заседании Диссертационного совета Д 212.081.08 при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008 г. Казань, ул. Кремлевская, д.18, ауд.211. Телефон: 7(843)23-37-842

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» www.kpfu.ru

Автореферат разослан «__» апреля 2014 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор



Абрамова З.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность исследования. В настоящее время увеличение продолжительности жизни в большинстве стран мира привело современное общество к стремительному старению и возникновению ряда новых проблем, одна из которых – лавинообразный рост числа тяжелейших переломов (Burge R. et al., 2007; Норой Л., 2010; Arakaki H. et al., 2011), наблюдаемых на фоне остеопороза (ОП) (Рожинская Л.Я., 2000; Беневоленская Л.И., 2003; Максимов М.Л., 2013). По данным ВОЗ, ОП занимает четвертое место среди неинфекционных заболеваний (Доскина Е.В., 2011). В настоящее время остается актуальным вопрос поиска новых эффективных и экономически более выгодных лекарственных средств, направленных на фармакологическую коррекцию данного заболевания. Особый интерес, как перспективные препараты для направленной транспортировки кальция в костную ткань (КТ), вызывают комплексные соединения кальция с аминокислотами (АК). Повышенное внимание к этому классу препаратов обусловлено, прежде всего, тем, что данные соединения обеспечивают лучшую ассимиляцию металла, чем при введении его в рацион в неорганической или какой-либо другой форме (Леменовский Д.А., 1997; Johansson A., 2008), тем самым обеспечивая повышение эффективности всасывания препаратов в желудочно-кишечном тракте и снижение вводимых доз вещества, к тому же для их усвоения не требуется витамин D₃ (Метельский С.Т., 2007; Ребров В.Г., Громова О.А., 2008; Громова О.А. и др., 2013). В настоящее время хелатные аминокислотные комплексы кальция (аакСа) входят в состав некоторых биологически активных препаратов. Между тем, научных исследований, направленных на изучение их химической структуры и связанной с ней биологической активности на процессы ремоделирования КТ и общее состояние организма, в отечественной литературе практически не встречается (Лунева С.Н., 2003), а единичных зарубежных исследований, носящих разрозненный характер (Xiao-hong Z. et al., 2006; Chaturvedi P. et al., 2008; Heaney R.P. et al., 2011), недостаточно для однозначных выводов о биологическом действии на организм данных комплексных соединений.

Таким образом, из-за широкого распространения ОП в популяции и его постоянного омоложения, коррекция метаболических нарушений КТ приобретает все большее значение. В настоящее время нет препарата для восполнения минеральной плотности КТ полностью отвечающего всем современным требованиям. Для создания такого препарата необходимо сочетание в его составе не только минеральной компоненты, но и органической составляющей КТ, так как без наличия органической матрицы невозможно протекание процессов ее минерализации. К тому же весьма перспективным является математическое моделирование новых химических соединений и, уже на основе этих данных, разработка препарата и его экспериментальная и клиническая апробация. Таким образом, исследования и разработка новых действенных препаратов в направлении от моделирования к применению являются актуальными и перспективными, необходимость их внедрения в практику не вызывает сомнения. Исходя из вышеизложенного, были определены цель и задачи исследования.

Цель исследования – оценка эффективности перорального введения синтезированных химическим путем аминокислотных комплексов кальция на биохимические показатели костного метаболизма в условиях антиортостатической гипокинезии и в процессе заживления перелома большеберцовой кости у экспериментальных животных.

Задачи исследования:

1. Исследовать биохимические изменения в сыворотке крови и костной ткани при антиортостатической гипокинезии у мышей и в процессе заживления перелома большеберцовой кости у крыс в условиях пищевого дефицита белка и кальция;
2. Получить аминокислотные комплексы кальция путем синтеза из неорганической соли и соответствующих аминокислот и изучить физико-химические свойства полученных соединений;
3. Сравнить эффективность перорального введения неорганической и органической форм кальция на биохимические показатели сыворотки крови и костной ткани мышей в условиях антиортостатической гипокинезии и крыс с переломом большеберцовой кости при обедненной белками и кальцием диете;
4. Оценить биологическую эквивалентность комплексных соединений кальция с различными аминокислотами и их дозозависимый эффект в эксперименте на крысах с переломом большеберцовой кости в условиях пищевого дефицита белка и кальция;
5. Изучить влияние перорального введения наиболее перспективной аминокислотной соли кальция на скорость остеосинтетических процессов в посттравматическом периоде у крыс с переломом большеберцовой кости при обедненной белками и кальцием диете.

Основные положения, выносимые на защиту:

- 1) Дефицит минеральных и белковых компонентов при антиортостатической гипокинезии и скелетной травме вызывает нарушения минерального и органического состава костной ткани и приводит к развитию остеомалации и остеопороза.
- 2) Пероральное введение синтетических аминокислотных комплексов кальция ускоряет биохимические процессы репарации костной ткани при переломах, предотвращает развитие деструктивных процессов при иммобилизации и способствует накоплению кальция в костях.

Объекты исследования. Сыворотка крови и костная ткань интактных крыс и крыс с переломом большеберцовой кости, а также интактных мышечных и мышечных после гравитационной разгрузки задних конечностей, синтетические аминокислотные комплексы кальция.

Научная новизна. С помощью модельных квантово-химических расчетов впервые получены основные данные о структуре комплексных соединений кальция с аминокислотами и основные термодинамические характеристики исследуемых веществ. Впервые на основе ИК-спектроскопии установлены особенности комплексообразования кальция с аминокислотами. Впервые изучена возможность создания биологически активной добавки к пище путем химического синтеза комплексных соединений из аминокислот и неорганических солей кальция, рассмотрены перспективы использования данных комплексов для восполнения недостатка кальция в организме. Впервые экспериментально доказано, что исследуемые аминокислотные комплексы кальция активируют процессы остеогенеза при пероральном способе введения, способствуя достоверному накоплению кальция в скелете. Определены количественные и качественные особенности изменения биохимических показателей крови и костной ткани при введении аминокислотных комплексов кальция в процессе заживления переломов большеберцовой кости и при иммобилизационной антиортостатической гипокинезии.

Теоретическая и практическая значимость работы. Показано, что экспериментальные данные об условиях образования, составе и основных термодинамических характеристиках комплексных соединений кальция с аминокислотами, а также о характере координации органических лигандов с атомом биогенного металла являются основой для разработки новых биологически активных веществ. Полученные в ходе исследования данные демонстрируют, что пероральное введение глицината и лизината кальция, смеси аминокислотных комплексов кальция активизирует биохимические процессы восстановления костной ткани при переломах большеберцовой кости, способствуя более быстрому созреванию костного матрикса и накоплению кальция в костях в посттравматическом периоде. Дополнительная добавка к ежедневному рациону в виде глицината кальция в условиях обедненной белками и кальцием диеты способствует увеличению минеральной плотности скелета, предотвращая развитие остеопении. С целью профилактики и превентивных мер, направленных на предотвращение падения минеральной плотности костной ткани целесообразно включать в ежедневный рацион аминокислотные комплексы кальция. Полученные данные имеют существенное значение для экспериментальной биологии, практической медицины и после клинических исследований могут быть внедрены в практику. Результаты исследований рекомендуются использовать в дальнейших научных разработках при изучении влияния аминокислотных комплексов кальция на процессы метаболизма костной ткани в норме и при патологии. Полученные в ходе исследования данные и предложенные экспериментальные модели могут быть использованы при проведении научно-исследовательских работ.

Апробация работы. Основные положения доложены на научно-практической конференции молодых ученых «Аспирантские чтения. Современные проблемы послевузовского образования» (Курган, 2011); Российской конференции с международным участием «Илизаровские чтения» (Курган, 2012), на 8-ом съезде травматологов и ортопедов УРФО «Чаклинские чтения-2012» (Екатеринбург, 2012); на заседании научного общества ортопедов-травматологов (Курган, 2012), на VIII Международной (XVII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2013), на II Международном форуме «Инновации в медицине: основные проблемы и пути их решения. Высокотехнологичная медицина как элемент инновационной экономики» (Новосибирск, 2013). Работа стала дипломантом молодежного инновационного конкурса «У.М.Н.И.К. – 2012» по Курганской области.

Публикации: по теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 3 – в рецензируемых журналах по перечню ВАК Минобразования РФ.

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в проводимом эксперименте и динамическом наблюдении за животными. Проведенные квантово-химические расчеты, а также материал, предоставленный в диссертации, собран, обработан и проанализирован лично автором.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 125 страницах без списка литературы, включая 30 таблиц, 20 рисунков. Состоит из введения, литературного обзора, описания материалов и методов, 5 глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка цитируемой литературы из 269 источников, среди которых 195 - отечественные, 74 – зарубежные. Диссертационная работа выполнена по плану НИР ФГБУ РНЦ «ВТО» им. академика Г.А. Илизарова № 035/5-14.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 67 мышах-самцах линии СВА массой тела 25-30 г и 78 крысах линии Wistar массой тела 300±50 г. Осуществлен синтез восьми и изучение структуры и строения пяти аминокислотных комплексов кальция.

Содержание животных, оперативные вмешательства и эвтаназию осуществляли в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных; «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу Минздрава СССР от 12.08.1977 № 755); требованиями инструкции №12/313 Министерства здравоохранения РСФСР «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментальных биологических клиник» от 06.01.1973 г.

Эксперимент был выполнен в два этапа. На первом этапе синтезировали и изучили физико-химические свойства аакСа. При построении молекулярных моделей АК и аакСа использовали графический редактор программного комплекса HyperChem (Соловьев М.Е., 2005), геометрию молекулярных моделей комплексов оптимизировали полужэмпирическим методом PM-3 (Schmidt M.W. et

al., 1993; Кобычев В.Б., 2006; Новоковская Ю.В., 2010). Исходными реактивами для синтеза служили глицин и α -АК L-ряда: лейцин, изолейцин, лизин, метионин, аргинин, пролин, фенилаланин марки ч.д.а. (Sigma-Aldrich, США) и безводный хлорид кальция марки ч.д.а. (Реактив, Россия). АакСа получали смешиванием растворов соответствующей АК и хлорида кальция (Накоскин А.Н. и др., 2012). Для качественного исследования состава полученных комплексов и полноты протекания химической реакции проводили прямое титрование раствора хлорида кальция глицином и наоборот. После установления состава анализируемого соединения смешивали растворы из расчета 1 моль хлорида кальция на 2 моль АК. Раствор замораживали и подвергали низкотемпературной вакуумной сушке на приборе LioLab 3000 (Heto-Holten, Дания) при $-56 \pm 2^\circ\text{C}$ и давлении 0,4 Па. Исследование структуры синтезированных аакСа проводили на ИК-Фурье спектрометре Nikolet 6700 (INTERTECH Corporation, США).

На втором этапе исследуемые комплексные соединения были протестированы на биологическую активность.

В первой серии экспериментов исследовали общие закономерности видового состава здоровой КТ и сыроворотку крови (СК) на интактных мышах (13 животных) и крысах (7 животных).

Во второй серии экспериментов исследовали эффективность применения аакСа для регуляции метаболизма КТ, в условиях обедненной белками и кальцием диеты (ОБКД) на модели антиортостатической гипокинезии путем гравитационной разгрузки задних конечностей (ГРЗК) у мышей (Ломоносова Ю.Н. и др., 2009) и у крыс с переломом большеберцовой кости (ПББК) (Ирьянов Ю.М. и др., 2010).

Эффективность перорального потребления глицината кальция изучали на взрослых половозрелых мышах-самцах линии СВА. Животные были разделены на 3 экспериментальные группы, каждая из которых содержалась на ОБКД (хлеб из муки второго сорта и дистиллированная вода).

Первая (контрольная) группа ($n=18$) мышей служила группой сравнения. Во **второй** группе ($n=18$) мышам дополнительно ежесуточно перорально вводился раствор глицината кальция, содержащий 1 мг Ca^{2+} на животное в сутки. **Третьей** группе ($n=18$) дополнительно ежесуточно перорально вводился раствор хлорида кальция, содержащий 1 мг Ca^{2+} на животное в сутки.

В условиях заживления экспериментального ПББК изучали изменения костного метаболизма при пероральном потреблении аакСа у половозрелых крыс обоего пола линии Wistar. Крыс, согласно экспериментальным условиям, разделили на 9 групп. Все животные после операции по моделированию ПББК содержались на ОБКД. **В первую** (контрольную) группу входили 9 крыс. **Вторую** группу составили 9 крыс, которые дополнительно имели свободный доступ к раствору $\text{Ca}(\text{гли})_2$ в концентрации 10 мг/крысу в сутки в пересчете на Ca^{2+} . **В третьей** группе 9 крыс дополнительно получали по 10 мг Ca^{2+} на животное в составе раствора соли хлорида кальция. **Четвертая** группа животных ($n=9$) ежесуточно получала добавку к питанию в виде раствора глицина в количестве 37,5 мг на каждое животное. **Пятую** группу составили 9 крыс, которые дополнительно имели свободный доступ к раствору $\text{Ca}(\text{мет})_2$ в концентрации 50

мг/крысу в сутки в пересчете на Ca^{2+} . В **шестой** группе 12 крыс дополнительно получали по 50 мг Ca^{2+} на животное в составе раствора смеси комплексных соединений $\text{Ca}(\text{mix})_2$, содержащей в равных молярных соотношениях аминокислоты глицин, лизин, метионин, фенилаланин, аргинин, лейцин, изолейцин и пролин. **Седьмая** группа животных ($n=4$) ежедневно получала добавку к питанию в виде раствора $\text{Ca}(\text{лиз})_2$ в количестве 50 мг элементарного кальция на крысу. **Восьмую** (контрольную) группу составили 5 самок крыс в одинаковой стадии экстрального цикла. **Девятую** группу составили 5 самок в одинаковой стадии экстрального цикла, которые имели свободный доступ к раствору $\text{Ca}(\text{лиз})_2$ в пересчете на 50 мг элементарного кальция на животное.

Из эксперимента мышей и крыс 1-6 групп выводили декапитацией после предварительного наркотизирования на 7, 14 и 28 сутки, крыс 7-9 групп – на 28-е сутки. Все манипуляции на мышах проводили под ингаляционным эфирным наркозом, на крысах – под общим наркозом путем внутримышечной инъекции по 0,2 мл каждого из препаратов Рометар и Золетил после их разведения физиологическим раствором в 5 раз.

Для оценки интенсивности костного метаболизма у экспериментальных мышей в СК определяли общее содержание кальция, неорганического фосфата, магния, активность щелочной (ЩФ) и тартрат-резистентной кислот (трКФ) фосфатаз. У крыс в СК определяли содержание общего и ионизированного кальция, неорганического фосфата, общего магния, активность ЩФ и трКФ (кислот фосфатазы – для 8 и 9 группы крыс), общий белок биуретовым методом, концентрацию сиаловых кислот набором реагентов «СиалоТест 100» (Россия, СПб). В бедренных костях животных изучали содержание кальция, фосфата и коллагена (Col).

Для исследования активности ЩФ (К.Ф. 3.1.3.1.) и трКФ (К.Ф. 3.1.3.2.), а также количественного содержания электролитов использовали наборы фирмы «Vital Diagnostics Spb» (Россия), автоматические биохимические анализаторы «Stat Fax® 1904 Plus» (США) и Hitachi 902 (Швейцария).

Для оценки преобладания процессов костеобразования над процессами резорбции КТ был рассчитан индекс фосфатаз = $\text{ЩФ}/\text{трКФ}$ (КФ – для 8 и 9 групп) (Десятниченко К.С., 1999). Концентрацию ионизированного кальция рассчитывали из содержания общего кальция по белку сыворотки (Данилова Л.А. и др., 2003).

Для анализа КТ экспериментальных и контрольных групп животных выделяли большеберцовую кость (ББК) обеих конечностей. После вакуумной сушки в гомогенате КТ определяли количество Col по оксипролину (Шараев П.Н. и др., 1990) и содержание минеральных компонентов – кальция и фосфатов наборами реагентов фирмы «Vital Diagnostics Spb» (Россия).

Для статистической обработки данных использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (Гланц С., 1999). Достоверными считали различия при $p < 0,05$. При статистической обработке результатов исследования был использован интеграторный модуль AtteStat 1.0, разработанный в лаборатории информационно-вычислительного центра РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова И.П. Гайдышевым (Гайдышев И.П., 2004).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка костного метаболизма при антиортостатической гипокинезии и переломе большеберцовой кости голени.

Проведенные исследования выявили, что 28-суточное вывешивание мышей за хвостовую складку под углом 45° при содержании животных на ОБКД оказывало существенное влияние на все исследуемые биохимические показатели костного обмена (рис. 1). Происходило достоверное повышение содержания уровня сывороточного кальция, регистрировалась выраженная тенденция снижения содержания Ca^{2+} в КТ обездвиженных задних конечностей на 14-е и 28-е сутки эксперимента соответственно до 14,98 ($p<0,05$) и 14,30 ($p<0,05$) мг/100 мг кости при нормальном уровне костного кальция 16,20 мг/100 мг. На фоне снижения уровня кальция наблюдали относительный рост содержания в КТ Col на 35,9 ($p<0,01$) и 54,8% ($p<0,001$) к 14-м и 28-м суткам вывешивания.

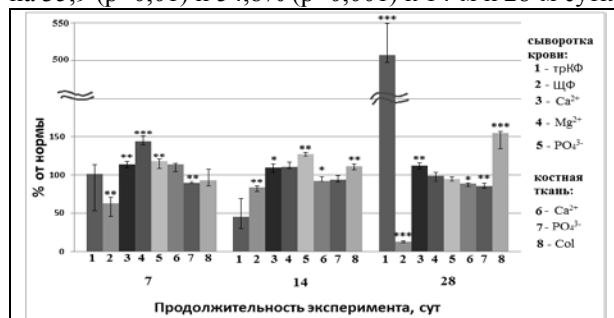


Рис. 1. Динамика биохимических показателей СК и КТ мышей, содержащихся на ОБКД в условиях ГРЗК.

Примечание: * - $p<0,05$; ** - $p<0,01$; *** - $p<0,001$ – достоверные различия при сравнении интактной группы с контрольной.

В начальный период иммобилизации наблюдалось резкое возрастание содержания магния в СК на 44,4% ($p<0,001$). Как правило, концентрационный сдвиг содержания магния в положительную сторону стимулирует процессы активизации функции остеокластов (Поворознюк В.В., Григорьева Н.В., 2011), что подтверждалось в

эксперименте значительным возрастанием активности трКФ в СК к концу эксперимента с 3,3 до 15,4 Ед/л ($p<0,001$); на этом же сроке отмечалось снижение функциональной активности ЩФ на 87% ($p<0,001$). У подопытных животных регистрировался рост уровня сывороточного фосфат-иона с 1,98 ммоль/л до 2,52 ($p<0,01$) и 2,73 ($p<0,01$) ммоль/л на 7-е и 14-е сутки эксперимента. Происходившее к концу эксперимента падение уровня неорганического фосфора в КТ на 17,5% с 28,76 мг/100 мг у интактных животных до 24,47 ($p<0,01$) мг/100 мг также указывало на преобладание катаболических процессов в КТ мышей в период ГРЗК.

Костный обмен крыс в посттравматическом периоде характеризовался временным повышением на 7-е и 14-е сутки эксперимента уровня общего кальция (рис. 2). На начальных сроках заживления перелома (7-е и 14-е сутки) наблюдали достоверный спад активности ЩФ с 169,9 Ед/л у интактной группы соответственно до 118,8 ($p<0,05$) и 99,3 ($p<0,05$) Ед/л, нормализация синтетической активности остеобластов и, следовательно, увеличение концентрации продукта их деятельности происходила к 28-ым суткам после

операции. Установили, что на 28-е сутки после операции соотношение индекса фосфатаз значительно превышало дооперационные значения.

Зарегистрированный на 14-е послеоперационные сутки рост содержания сиаловых кислот в СК свидетельствовал об обострении на этом сроке воспалительных и резорбтивных процессов. В частности, в ответ на травму на 7-е сутки после операции регистрировалось снижение уровня общего белка, обусловленное, в первую очередь, преобладанием катаболических процессов в начальный посттравматический период и недостаточным поступлением белка с пищей.

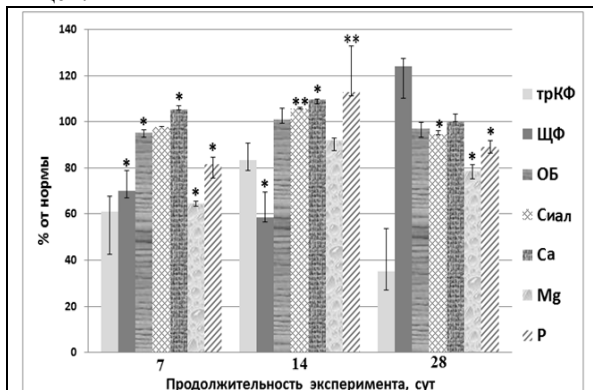


Рис. 2. Динамика биохимических показателей СК крыс с ПББК, содержащихся на ОБКД.

ОБ – общий белок; Сиал – сиаловые кислоты; P – неорганический фосфат.

Примечание. см. рис. 1.

сменялись к 14-м суткам периодом накопления основного минерала в обеих конечностях. Однако в условиях ОБКД к 28-м суткам фиксации не происходило полного восстановления содержания остеотропного элемента в месте консолидации костных отломков.

В течение всего периода фиксации в условиях ОБКД прослеживалась четкая тенденция потери Col, как в здоровой, так и в травмированной конечности соответственно на 29,34% ($p < 0,05$) и на 37,44% ($p < 0,05$) к концу срока фиксации при нормальном уровне метаболита 17,76 мг/100 мг кости.

Таким образом, в условиях 28-суточной ГРЗК на фоне ОБКД у мышей регистрируется снижение содержания кальция и фосфата в КТ, в СК наблюдается повышение активности трКФ и концентрации кальция, снижение активности ЩФ.

Перераспределение ионов Ca^{2+} в КТ после травмы сопровождалось лизисом кальция из нетравмированных частей скелета и постепенным накоплением его в месте перелома (рис. 3). Катаболические процессы с выбросом в кровоток кальция на начальном сроке фиксации (падение содержания кальция в травмированной и контрлатеральной (КЛ) конечностях на 16,5 ($p > 0,05$) и 25,4% ($p < 0,01$))

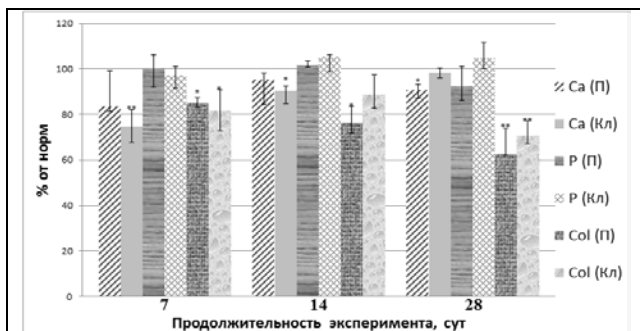


Рис. 3. Динамика биохимических показателей костной ткани крыс с ПББК в условиях ОБКД.

Π – перелом; Кл – контрлатеральная конечность.

Примечание. см. рис. 1.

В условиях ПББК на фоне ОБКД в КТ крыс регистрируется на начальном этапе эксперимента падение уровня кальция и Col, в СК снижение концентрации фосфат-иона, активности ЩФ, гипопроteinемия и гипомагнемия, рост содержания кальция. ОБКД усугубляет глубину протекающих в

КТ деструктивных процессов, тормозит процессы репаративного остеосинтеза, отодвигая активацию анаболических процессов в посттравматическом периоде на более поздние сроки.

Разработка средства на основе синтетических аминокислотных комплексов кальция, направленного на профилактику и восполнение потерь минеральной плотности костной ткани.

Квантово-химическое моделирование структуры аминокислотных комплексов кальция. Нами были построены молекулярные модели для аминокислотных комплексов кальция с глицином, аланином, лейцином, лизинем и аргинином с геометрией, оптимизированной полуэмпирическим методом PM-3 (Сигал Дж., 1980; Кобзев Г.И., 2004; Блатов В.А. и др., 2005), рассчитаны геометрические характеристики связи кальций-глицин и термодинамические функции исследуемых молекул. Выявлено, что при образовании комплекса с кальцием в молекулах глицина происходят изменения, касающиеся только ближайших к атому кальция связей. Связь кальция с атомами кислорода носит ионный характер, азот аминокислотной группы АК не принимает участие в образовании связи.

Таким образом, модельными расчетами подтверждена возможность образования устойчивых комплексных соединений кальция с АК глицин, аланин, лейцин, лизин, аргинин состава $\text{Ca}(\text{АК})_2$.

Синтез аминокислотных комплексов кальция. После установления расчетными и экспериментальными методами оптимального состава аакСа нами были синтезированы комплексы кальция с АК: гли, лиз, мет, лей, иле, фен, про, арг. Полученные соединения представляют собой белый кристаллический порошок, очень хорошо растворимы в воде.

Исследование структуры синтетических аминокислотных комплексов кальция методом ИК-спектроскопии. С целью получения данных о наличии связи металл-лиганд при образовании комплекса кальция с АК были сняты ИК-спектры поглощения исходных АК и их бинарных комплексов с кальцием (рис. 4).

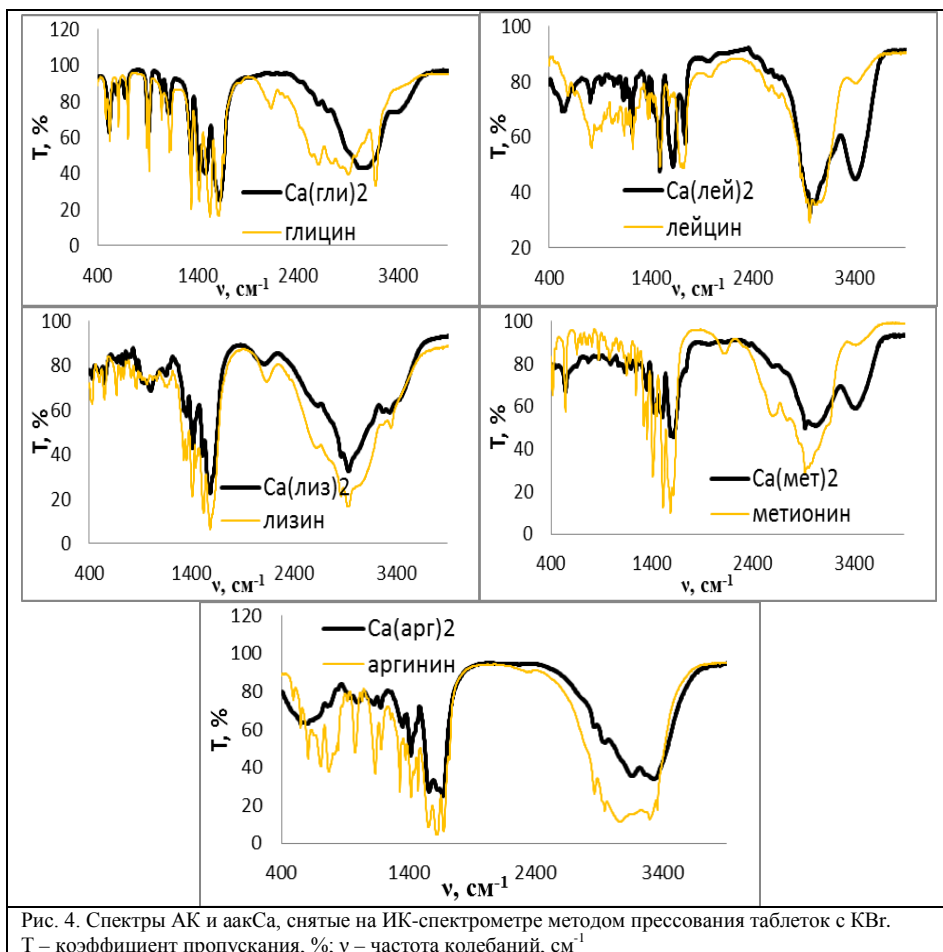


Рис. 4. Спектры АК и аакСа, снятые на ИК-спектрометре методом прессования таблеток с KBr.
 T – коэффициент пропускания, %; ν – частота колебаний, см^{-1}

Наибольшие различия при рассмотрении ИК-спектров регистрировали в областях валентных колебаний аминокрупп: происходило общее смещение «аммонийной полосы» в высокочастотную область, исчезновение или падение интенсивности пика NH_3^+ группы и появление максимумов поглощения свободных NH_2 групп. При взаимодействии кальция с цвиттер-ионами аминокислот не наблюдалось появление пиков координированной аминокруппы, регистрировалось повышение частот валентных колебаний $\nu_{\text{as}}(\text{NH}_2)$ и $\nu_{\text{s}}(\text{NH}_2)$. Валентные симметричное ν_{s} и асимметричное ν_{a} колебания $-\text{COO}^-$ группы не претерпевали существенных изменений, что может указывать на ионный характер связи в исследуемых комплексах.

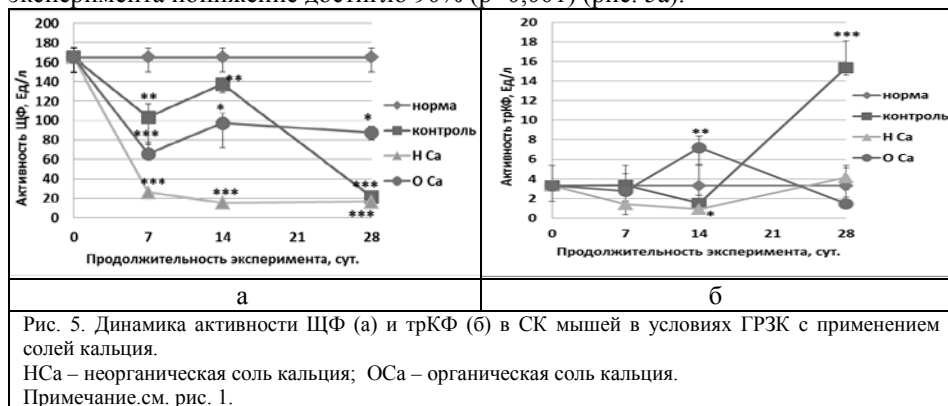
Таким образом, нами выявлено, что образование связи между АК и кальцием происходит за счет взаимодействия карбоксильного кислорода АК с ионом кальция. К тому же, так как полосы валентных колебаний COO^- групп не

испытывают заметного смещения относительно полос исходных цвиттер-ионов лигандов, можно судить об ионном типе связи Ca–O.

Сравнение эффективности применения органической и неорганической соли кальция для профилактики снижения минеральной плотности костной ткани.

Нами было проведено изучение в сравнительном аспекте влияния перорального введения неорганической (CaCl_2) и органической ($\text{Ca}(\text{гли})_2$) соли кальция на биохимические показатели СК и КТ мышей в условиях ГРЗК и крыс в процессе сращения ПББК при ОБКД.

Наиболее чувствительной к иммобилизации в условиях ОБКД оказалась ферментативная активность СК. Введение в пищевой рацион неорганической соли не предотвратило резкое снижение активности ЩФ. К 7-ым суткам активность анализируемого фермента снизилась на 84% ($p < 0,001$), к концу эксперимента понижение достигло 90% ($p < 0,001$) (рис. 5а).



Уровень ЩФ в СК животных с дополнительным введением в рацион органической формы кальция снижался менее интенсивно: максимальное падение на 60% ($p < 0,001$) было зафиксировано на 7-е сутки после ГРЗК, в дальнейшем активность фермента немного возросла. Пероральное введение солей кальция препятствовало значительному росту активности маркера деструкции клеток КТ – трКФ (рис. 5б). Нами зарегистрировано достоверное повышение содержания уровня сывороточного кальция во всех подопытных группах (рис. 6а). Для установления источника поступления кальция в кровоток контролировали уровень костного и сывороточного иона (Lemann J.I., 1993; Peacock M., 2010). Деструктивных процессов в КТ мышей с дополнительным поступлением в пищевой рацион неорганической соли кальция на исследуемых сроках эксперимента выявлено не было.

Наблюдаемое в группе животных с дополнительным введением органической соли постепенное накопление кальция в КТ на фоне повышения его концентрации в СК свидетельствовало о том, что электролит поступал в кровь не за счет процессов резорбции кости, а из желудочно-кишечного тракта в составе органического соединения. При анализе включения в состав КТ кальция в

условиях ОБКД к концу эксперимента отметили достоверный рост содержания данного минерала в КТ мышей при его введении в органической форме на 16,99% ($p<0,05$) относительно группы мышей, в рацион которых данный элемент поступал в виде неорганической соли.

Для более полного анализа качества КТ рассчитывали коэффициент $\text{Ca}^{2+}/\text{Col}$, позволяющий оценить сдвиги в соотношении минеральной и органической компоненты. Восполнение кальциевой недостаточности за счёт обогащения пищевого рациона органической солью кальция сопровождалось сохранением соотношения Ca/Col в пределах нормы (рис. 6б). В группе мышей с пероральным введением неорганической формы кальция данное соотношение было достоверно ниже нормы за счет повышения уровня Col в КТ.

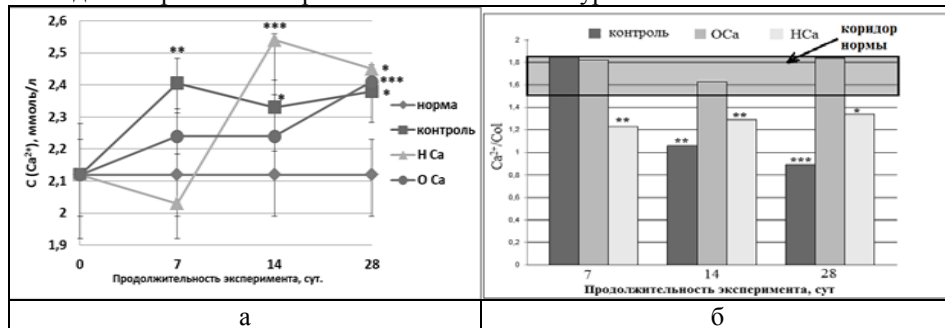
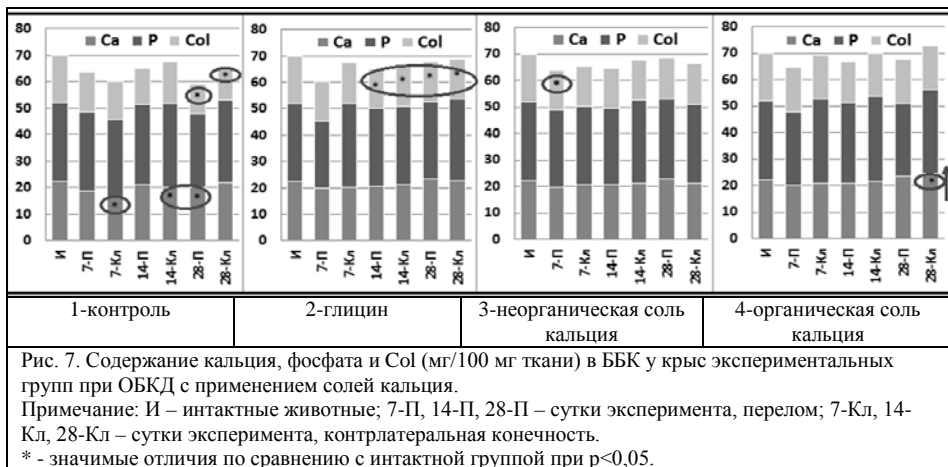


Рис. 6. Концентрация общего кальция в СК (а) и соотношение минеральной (Ca^{2+}) и органической (Col) компоненты в КТ мышей (б) в условиях ГРЗК и ОБКД с применением солей кальция.

ОСа – органическая соль кальция; НСа – неорганическая соль кальция.

Примечание см. рис. 1.

Применение в качестве дополнительного источника кальция его неорганической соли у крыс с ПББК при ОБКД приводило к восстановлению уровня остеотропного элемента на 28-е сутки до дооперационных показателей (рис. 7). При введении кальция в органической форме на 28-е сутки при сравнении с дооперационными показателями выявили в КЛ кости достоверный рост содержания кальция на 11,5% при $p<0,05$. Дополнительное введение экзогенной АК в период сращения костных отломков не предотвратило потерю органической компоненты кости, однако препятствовало снижению содержания кальция в обеих конечностях. Следует отметить тот факт, что, когда применялась органическая соль кальция, к концу эксперимента отмечался рост содержания Col в КТ до уровня дооперационных показателей, в то время как в группе с введением неорганической соли данное явление было выражено слабее.



Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что пероральное введение неорганической формы кальция в условиях 28-суточной ГРЗК на фоне ОБКД предотвращало развитие деструктивных процессов в обездвиженных конечностях, способствовало восполнению минерального состава КТ в 28-суточный период после травмы ББК. Стимуляция костного обмена за счет дополнительного введения экзогенного кальция в органической форме приводила к повышению содержания кальция в костях мышей при 28-суточной иммобилизации, ускоряла сроки минерализации костных отломков в процессе сращения ПББК у крыс, приводя к достоверному накоплению кальция в костях. Сравнение биодоступности органической и неорганической форм кальция для КТ выявило, что введение в рацион животных органической формы остеотропного элемента являлось более эффективным, так как наблюдалось не только нивелирование отрицательных последствий в результате иммобилизации и при нарушении целостности кости, но и происходило достоверное накопление минерального компонента в скелете экспериментальных животных относительно аналогичных показателей группы интактных животных.

Определение биологической эквивалентности различных аминокислотных комплексов кальция и их дозозависимый эффект.

Для установления оптимального состава входящих в комплексное соединение АК нами был проведен мониторинг эффективности усвоения смеси аакСа, метионата кальция и лизината кальция. При определении дозозависимого эффекта сравнивали влияние разных концентраций вводимого препарата на биохимический состав СК и КТ крыс с ПББК.

Сравнительный анализ количественного состава костей крыс, в рацион которых, в первом случае входила смесь аакСа, а во втором – лизинат кальция не выявил существенных различий в содержании кальция, фосфата и Col к концу эксперимента (рис. 8).

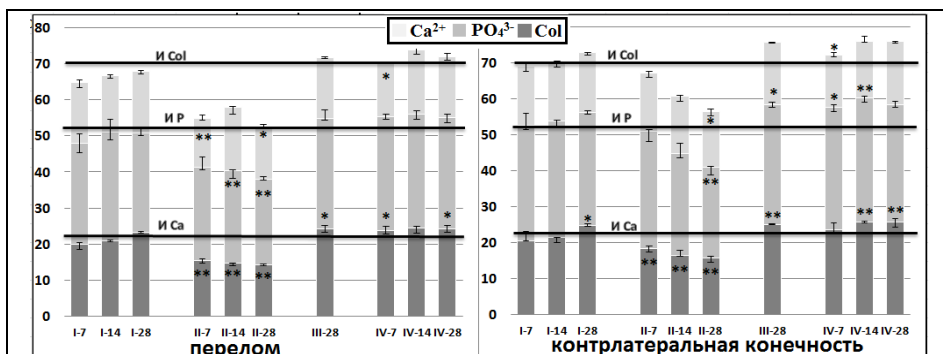


Рис. 8. Содержание кальция, фосфата и Col (мг/100 мг) в ББК у крыс в месте перелома и в КЛ конечности при пероральном введении аакСа в условиях ОБКД.

I-глицинат кальция, II-метионат кальция, III-лизинат кальция, IV-смесь аакСа;

7, 14, 28 – сутки эксперимента;

И Ca, И P, И Col – содержание кальция, фосфата и Col в ББК intactных животных.

Примечание: см. рис. 1.

Исследование показало, что пятикратное повышение дозы вводимого кальция в составе аминокислотных комплексов значительно сокращало сроки наступления анаболической фазы, характеризующейся накоплением основных минеральных компонентов в скелете, с 28-ми до 7-ми суток. Однако к концу эксперимента достоверных различий в содержании кальция в ББК обеих конечностей между I, III и IV группами выявлено не было.

Наличие отталкивающих органолептических свойств раствора содержащего метионат кальция, привело к отказу от его потребления экспериментальными животными, и, как следствие, к обезвоживанию организма, усиливающего процессы костной деминерализации. В течение всего срока эксперимента наблюдалось постепенное снижение содержания кальция с 22,17 до 14,29 мг/100 мг в месте перелома и до 15,74 мг/100 мг в нетравмированной ББК. В процентном соотношении достоверная убыль в месте перелома на 7-е, 14-е и 28-е сутки после получения травмы составила соответственно 30,7 ($p<0,01$), 33,6 ($p<0,01$), 35,5% ($p<0,01$) и в здоровой ББК – 17,2 ($p<0,01$), 25,8 ($p<0,01$), 29,0% ($p<0,01$).

Таким образом, в силу того, что метионат кальция в высокой концентрации обладает отталкивающими для животных органолептическими показателями (запах), изучить его включение в рацион крыс не предоставляется возможным. Повышение дозы вводимого препарата аакСа сокращает с 28-ми до 7-ми суток сроки активации остеосинтетических процессов в КТ. На 28-е сутки не выявляется достоверных различий в содержании кальция и фосфата в ББК крыс с дополнительным пероральным поступлением в рацион 10 и 50 мг элементарного кальция в составе аминокислотных комплексов кальция.

Экспериментальная апробация препарата аминокислотной соли кальция для восполнения недостатка кальция при переломе большеберцовой кости.

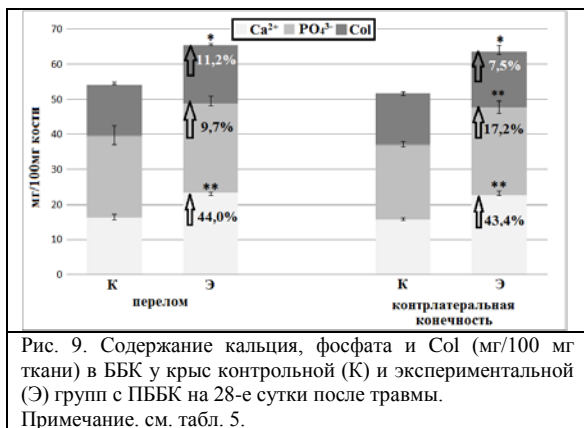
При заживлении ПББК у самок крыс, находящихся в пострепродуктивном периоде на фоне ОБКД, наблюдалось повышение активности кислой фосфатазы более чем в 5 раз ($p<0,01$), активность ЩФ была достоверно ниже, чем в группе животных с дополнительным поступлением в организм $\text{Ca}(\text{лиз})_2$ (табл. 5). Повышенные значения индекса фосфатаз при 28-суточном поступлении в организм животных аакСа указывали на остеосинтетические процессы, активно протекающие на фоне снижения в СК уровня магния на 9,8% ($p<0,01$), общего и ионизированного кальция соответственно на 36,3 ($p<0,01$) и 39,5% ($p<0,01$).

Высокие показатели уровня кальция в крови крыс контрольной группы, вероятнее всего, свидетельствовали о протекании ярко выраженных деструктивных процессов в скелете. В СК крыс опытной группы отмечалось значимое повышение содержания неорганического фосфата, низкая концентрация сиаловых кислот в посттравматическом периоде свидетельствовала о более ранней нормализации процессов распада органического компонента костного матрикса, характеризующего высокую интенсивность восстановительных процессов. Содержание общего белка в условиях ОБКД при дополнительном введении препарата кальция было значительно выше, чем в группе контроля, что также являлось благоприятным фактором репаративных процессов в КТ.

Таблица 1
Основные биохимические показатели СК самок крыс с ПББК в условиях ОБКД¹

Показатель, ед. изм.	Группа животных	
	Контрольная (n=5)	Опытная(n=5)
Кислая фосфатаза, Ед/л	9,6 (8,7;10,1)	1,8** (1,7;2,5)
Щелочная фосфатаза, Ед/л	111,4 (86,3;118,6)	133,3* (124,4;150,9)
Индекс фосфатаз	12,4 (8,5;14,7)	66,2** (57,7;69,1)
Общий белок, ммоль/л	49,9 (48,9;52,5)	57,4** (56,1;57,9)
Сиаловые кислоты, моль/л	4,65 (4,43;4,78)	4,17** (4,02;4,27)
Ca^{2+} , ммоль/л	2,89 (2,82;2,90)	1,84** (1,84;1,89)
$\text{Ca}^{2+}_{\text{ион}}$, ммоль/л	1,52 (1,50;1,55)	0,92** (0,91;0,92)
Mg^{2+} , ммоль/л	0,82 (0,81;0,84)	0,74** (0,74;0,76)
PO_4^{3-} , ммоль/л	1,62 (1,60;1,66)	1,74* (1,68;1,81)
¹ - в таблице представлены медианы значений и интерквартильный размах признака М (25%; 75%). Примечание: * - $p<0,05$; ** - $p<0,01$; *** - $p<0,001$ – достоверные различия при сравнении контрольной группы с опытной.		

Качественные изменения состава КТ крыс через 28 суток после перелома при пероральном введении лизината кальция затрагивали как минеральную составляющую скелета, так и органическую (рис. 9).



Изучение биохимических показателей КТ животных после приема лизината кальция показало, что в месте перелома и в КЛ конечности прирост содержания кальция соответственно составил 44,0 ($p<0,01$) и 43,4% ($p<0,01$), фосфата – 9,7 ($p>0,05$) и 17,2% ($p<0,01$), Col – 11,2 ($p<0,05$) и 7,5% ($p<0,05$). Отношение Ca/P, характеризующее

качественный состав минеральной фазы матрикса в 1,13 ($p<0,01$) и 1,23 ($p<0,01$) раза превышал значения аналогичного показателя контрольной группы крыс соответственно в месте перелома и в КЛ конечности.

Таким образом, применение лизината кальция в качестве препарата для восполнения дефицита кальция на фоне обедненного белками и кальцием рациона приводит к снижению активности кислой фосфатазы, повышению функциональной активности остеобластов, вырабатывающих ЦФ, снижению уровня кальция и магния, повышению содержания неорганического фосфата и ОБ, падению концентрации СК; в КТ наблюдается увеличение содержания кальция, фосфата и Col, рост коэффициента Ca/P по сравнению с аналогичными показателями КТ контрольной группы.

ВЫВОДЫ

1. В условиях иммобилизационной гипокинезии на фоне обедненной белками и кальцием диеты у мышей происходит развитие остеомалации, выражающееся в снижении содержания кальция и фосфата в костной ткани, повышении активности тартратрезистентной кислой фосфатазы и концентрации кальция, снижении активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови.
2. При переломе большеберцовой кости на фоне недостатка белка и кальция в костной ткани крыс наблюдается падение уровня кальция и коллагена, в сыворотке крови – снижение концентрации неорганического фосфата, магния, общего белка, активности щелочной фосфатазы, что в целом соответствует картине остеопороза.
3. Термодинамическими расчетами подтверждено образование устойчивых комплексных соединений кальция с аминокислотами состава $\text{Ca}(\text{AK})_2$. Методом ИК-спектроскопии установлено: спектры синтезированных соединений кальция с аминокислотами принципиально отличаются от спектров исходных аминокислот; отмечено отсутствие взаимодействия азота аминокислотной группы с атомом металла; связь кальция с кислородом карбоксильной группы аминокислоты носит ионный характер.

4. Аминокислотный состав комплексов кальция не является определяющим фактором при адресной доставке остеотропного элемента в кость; повышение дозы вводимого препарата значительно сокращает сроки активации анаболических процессов.

5. Пероральное введение аминокислотных комплексов кальция позволяет не только предотвратить развитие деструктивных процессов в костной ткани у экспериментальных животных, но и способствует достоверному накоплению в ней кальция.

6. Введение в рацион животных с выраженными старческими изменениями синтетических аминокислотных комплексов кальция приводит к нормализации основных биохимических показателей сыворотки крови и к улучшению качественного состава костной ткани.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

- 1) Ваганова Л.А. Квантово-химическое моделирование аминокислотных комплексов кальция и оценка возможности их применения для восполнения дефицита кальция [Электронный ресурс] / А.Н. Накоскин, Б.С. Воронцов, С.Н. Лунева, **Л.А. Ваганова** // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 3. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/103-6224> (Список ВАК, РИНЦ-0,204; авт. 0,38 п.л.).
- 2) Ваганова Л.А. Синтез глицината кальция и влияние его перорального введения на биохимические показатели костного метаболизма мышцей и крыс / С.Н. Лунева, А.Н. Накоскин, **Л.А. Ваганова** // Химико-фармацевтический журнал. – 2013. – Т.47. – № 3. – С. 70-74. (Список ВАК, РИНЦ-0,390; авт. 0,26 п.л.).
- 3) Ваганова Л.А. Влияние глицината кальция на биохимические показатели состава костной ткани мышцей при гипокинезии / **Л.А. Ваганова**, А.Н. Накоскин // Вестник РГМУ. Периодическое медицинское издание. – М.: ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздравсоцразвития России. – 2013, Специальный выпуск №1. – С. 175-176. (Список ВАК, РИНЦ-0,081; авт. 0,05 п.л.).
- 4) Ваганова Л.А. Методические аспекты квантовохимического моделирования аминокислотных комплексов кальция / А.Н. Накоскин, Б.С. Воронцов, **Л.А. Ваганова** // Вестник Курганского государственного университета. – 2011. – № 2(21). – С. 120-123.
- 5) Ваганова Л.А. Метаболизм костной ткани крыс при пероральном введении аминокислотных комплексов кальция / С. Н. Лунева, А. Н. Накоскин, **Л. А. Ваганова** // Зауральский научный вестник. – 2012. – № 2. – С. 78-82.
- 6) Ваганова Л.А. Биохимические показатели сыворотки крови собак при заживлении внутрисуставных переломов вертлужной впадины / С.Н. Лунева, И.В. Шипицина, А.Н. Накоскин, **Л.А. Ваганова**, С.А. Мельников

- // Вестник Курганского государственного университета. – 2012. – №4 – С. 104-107.
- 7) Ваганова Л.А. Влияние глицината кальция на биохимические показатели сыворотки крови при сращении перелома голени у крыс / С. Н. Лунева, А. Н. Накоскин, **Л. А. Ваганова** // тез. конф. «Аспирантские чтения. Современные проблемы послевузовского образования»– Курган. – 2011. – С. 93-95.
- 8) Ваганова Л.А. Влияние глицината кальция на биохимические показатели костного метаболизма / С. Н. Лунева, А. Н. Накоскин, **Л. А. Ваганова** // тез.конф. «Илизаровские чтения». – Курган. – 2012. – С. 170-171.
- 9) Ваганова Л.А. Перспективы применения аминокислотных комплексов кальция для восполнения кальциевой недостаточности у крыс в посттравматическом периоде / С. Н. Лунева, А. Н. Накоскин, **Л. А. Ваганова** // Инновации в медицине: основные проблемы и пути их решения. Высотехнологичная медицина как элемент инновационной экономики: мат. II Междунар. Форума. – Новосибирск. – 2013. – С. 7-11.

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- аакСа – аминокислотные комплексы кальция;
- АК – аминокислоты;
- ББК – большеберцовая кость;
- ГРЗК – гравитационная разгрузка задних конечностей;
- КЛ – контрлатеральная;
- КТ – костная ткань;
- ОБКД – обедненная белками и кальцием диета;
- ОП – остеопороз;
- ПББК – перелом большеберцовой кости;
- Са(mix)₂ – смесь аминокислотных комплексов кальция;
- СК – сыворотка крови;
- Col – коллаген;
- трКФ – тартратрезистентная кислая фосфатаза (КФ 3.1.3.2);
- ЩФ – щелочная фосфатаза (КФ 3.1.3.1).

Тираж 100 экземпляров. Заказ № 3609.
Отпечатано в типографии «Печатный двор».
640000, г. Курган, ул. Гоголя, 16